

# Développements analytiques pour l'évaluation de la teneur en phytostérols des aliments : approche inter-laboratoires

Max FEINBERG

Institut National de la Recherche Agronomique.  
Met@risk,  
16 rue Claude Bernard. 75231 Paris cedex 05  
<feinberg@inapg.inra.fr>

**Abstract:** A set of collaborative studies was carried out on 6 food items in order to determine their contents phytosterols. The interest of these studies is to make it possible to calculate a certain number of figures of merit for methods known as of reference methods. Finally, the calculation of the function of uncertainty for these methods shows that uncertainty remains high, especially for the weak concentrations, and that it must have a substantial influence on the evaluation of phytostérols intake. Similarly, it can be concluded that the analysis of phytosterols in foods remains a delicate operation which would deserve more attention from standardization bodies, especially in the current context of supplementation of certain foods.

**Key words:** collaborative studies, content phytosterols, supplementation

## Introduction

Les aspects analytiques des phytostérols dans les aliments ont suscité un assez grand nombre de publications. En particulier, plusieurs organismes de normalisation ont développé il y a déjà quelques années des méthodes dites de référence, parmi lesquelles on peut citer les normes IUPAC 2.401 [1] et 2.403 [2], ISO 12228 [3] et AOCS Ch 6-91 [4]. Cependant, ces normes déjà anciennes sont destinées à l'analyse des huiles et corps gras et non pas à des aliments complexes. De plus, elles ne sont pas souvent accompagnées d'une étude inter-laboratoires qui permettrait de connaître leurs performances. Une revue récente de Lagarda *et al.* [5] présente un bilan détaillé des méthodes disponibles et des problèmes qu'elles soulèvent.

Les analyses circulaires ou inter-laboratoires ont pour objectif de caractériser plusieurs critères de validation des méthodes d'analyse, comme la répétabilité et la reproductibilité qui sont des critères de fidélité, mais aussi d'une certaine façon la justesse en permettant de définir une valeur commune de référence pour l'échantillon analysé. Par extension, on parle parfois de « validation » inter-laboratoires mais il s'agit plutôt d'une caractérisation des performances qui se révèle utile pour une validation véritable. Une série de normes internationales identifiées sous le numéro ISO 5725 ont été développées afin de conduire de façon harmonisée les analyses inter-laboratoires [6]. Un point important est le nombre de laboratoires qui participent à l'étude ; il doit être au moins de 8 afin que les résultats trouvés aient un poids normatif. Dans le contexte des travaux présentés ici, le nombre de laboratoires est de 4. Il faut donc considérer ces résultats comme indicatifs et ne pas les prendre au pied de la lettre. Il est ainsi évident que les valeurs de répétabilité et de reproduc-

tibilité auront tendance à être surestimées lorsque le nombre de laboratoires est trop faible, comme c'est le cas ici. Cependant, étant donné la rareté des données disponibles sur la fidélité et la justesse des méthodes d'analyse des phytostérols, cette étude est une contribution intéressante.

C'est aussi pour cette raison que nous avons essayé de modéliser les variations de la fidélité des méthodes étudiées en fonction de la concentration. Cette modélisation a été faite en s'appuyant sur les travaux bien connus de Horwitz [7, 8]. On peut ainsi proposer une fonction d'incertitude qui indique assez clairement le niveau de confiance qu'on peut attribuer aux mesures de phytostérols et qui peut être utilisée pour estimer l'incertitude des apports nutritionnels.

## Matériels et méthodes

### Échantillons et matériels

Pour l'analyse circulaire, 6 matrices ont été étudiées. Elles ont été sélectionnées car elles permettaient, *a priori*, de couvrir une large gamme de concentrations. Le *tableau 1* résume les caractéristiques de ces matériaux. Chaque échantillon doit être préparé avec soin et, en particulier, présenter la meilleure homogénéité

possible. Il est en effet important d'éviter qu'une hétérogénéité entre les échantillons qui sont envoyés aux participants n'entraîne une surestimation de la reproductibilité. Chaque laboratoire responsable de la préparation a aussi assuré l'expédition aux laboratoires participants.

Grâce à une étape de concertation préalable, les 4 laboratoires qui ont participé à l'étude ont pu s'entraîner à appliquer les méthodes sélectionnées de la façon la plus similaire possible. Les caractéristiques techniques des équipements analytiques employés sont résumées au *tableau 2*.

### Méthodes

L'analyse des stérols a été réalisée en s'inspirant de la méthode normalisée ISO 12228 [4] dont le principe est une détermination après une hydrolyse de l'échantillon en milieu acide, suivie : a) d'une extraction des phytostérols à l'éther de pétrole ; b) d'une purification sur colonne d'alumine ; puis c) d'une extraction sur phase solide ou par chromatographie sur couche mince.

La fraction correspondant aux phytostérols est silylée puis analysée par chromatographie en phase gazeuse avec un détecteur à ionisation de flamme (CPG-FID). Les détails de ce mode opératoire sont les suivants.

Tableau 1. Liste des échantillons utilisés pour l'analyse circulaire.

Nom	Abréviation	Laboratoire responsable de la préparation
Blé dur	BD	Aérial
Brocoli	BR	BBV
Chocolat	CH	Itegr
Haricots	HA	Aérial/ISHA
Huile de colza	HC	Itegr
Huile de noix	HN	Itegr

Tableau 2. Liste des laboratoires participants et matériel utilisé.

Laboratoire	Marque de la phase stationnaire <sup>a</sup>	Dimension	Intégrateur	Détecteur	Gaz vecteur
A	Varian WCOT fused silica	50 m × 0,25 mm × 0,25 µm	Non rapporté	FID	Hélium
B	HP-5MS	30 m × 0,25 mm × 0,25 µm	Perkin ElmerAutosystem XL	FID	Hydrogène
C	DB5	60 m × 0,25 mm × 0,25 µm	Shimadzu C-R6 A Chromatopac	FID	Hélium
D	DB5 - J & W	30 m × 0,25 mm × 0,25 µm	Thermo Electron Trace - ChromQuest	FID	Hydrogène

<sup>a</sup> La phase stationnaire utilisée est du 5 % phenyl 95 % diméthyl polysiloxane.

**Étape 1.** Extraction de la matière grasse (sauf pour les huiles). La prise d'essai d'environ 2,5 g, pesée exactement, subit une hydrolyse acide en étant placée dans un ballon de 250 mL avec 100 mL d'acide chlorhydrique 3M puis chauffée au reflux pendant 1 h. Au mélange refroidi, on ajoute 2,5 g de silice. La suspension est filtrée sur papier et le résidu solide est lavé à l'eau distillée jusqu'à neutralité des eaux de lavage, égoutté environ 2 h puis desséché à 105 °C pendant 90 minutes. L'extraction proprement dite se fait en mettant le résidu et le papier filtre dans une cartouche de Soxhlet obturée par de la laine de verre. Le Soxhlet est mis sur un ballon taré contenant 200 mL d'éther de pétrole et chauffé 6 h au reflux. L'extrait est évaporé sous vide et déposé dans un dessiccateur pendant 2 h avant d'être pesé. La quantité de matière grasse extraite est déterminée par la différence des pesées.

**Étape 2.** Extraction et purification des stérols. La matière grasse extraite subit une saponification par ajout de 5 mL de potasse alcoolique 0,5 M en présence de 500 µg de bêta-sitostérol ou épico-prostanol (étalon interne). Cette solution est maintenue au reflux pendant 15 minutes par un chauffage modéré. En fin de saponification, 5 mL d'éthanol sont ajoutés. Pour les huiles, la saponification est réalisée directement sur une prise d'essai de 0,25 g en présence de 1 mg de bêta-sitostérol.

Une prise d'essai de 5 mL d'insaponifiable est purifiée par passage sur une colonne remplie de 10 g d'alumine (granulométrie 63-200 µm) activée par 20 mL d'éthanol à 95 %. Le rinçage est effectué par 5 mL d'éthanol puis 30 mL d'éther éthylique. La prise d'essai et les solvants de rinçage sont récupérés puis évaporés dans un évaporateur rotatif. Le résidu sec est rincé 4 à 5 fois par 0,2 mL d'éther éthylique puis transféré dans un flacon à vis.

**Étape 3.** Isolement stérols. Il peut se faire par chromatographie sur couche mince (CCM) selon la norme ISO 12228. La solution de stérols extraits est déposée sur une plaque CCM recouverte de silice. L'élution est réalisée dans une cuve contenant 100 mL d'un mélange hexane/éther éthylique (1:1 v/v) jusqu'à ce que le solvant atteigne le bord supérieur de la plaque. Après évaporation du solvant, du méthanol a été pulvérisé sur la plaque. La zone correspondant aux phytostérols, de couleur blanche et nettement visible est récupérée et transférée dans un tube à essai. L'extraction des phytostérols est obtenue avec 0,5 mL d'éthanol puis 3 fois 5 mL d'éther éthylique. Le solvant et la silice sont à chaque fois séparés par centrifugation. L'extrait est évaporé puis repris dans de l'éther.

Mais on peut aussi utiliser une extraction sur phase solide (SPE). La quantité maximale de stérols qui peut être déposée sur la colonne SPE (Chromabond SiOH 3 mL 500 mg- Macherey-Nagel) et le volume d'éluant à utiliser ont été optimisés par un plan expérimental et fixés respectivement à 1 mg et 8 mL. La colonne d'extraction est préalablement conditionnée par 5 mL de cyclohexane. L'élution est réalisée par un mélange cyclohexane/éther éthylique (9:1, v/v) sous vide. La fraction récupérée est évaporée sous azote.

**Étape 4.** Quelle que soit la méthode d'extraction, 100 µL ou 200 µL d'un mélange de n-méthyl-N(triméthylsilyl)-heptafluorobutyramide et de 1-méthyl imidazole (20 :1 v/v) sont ajoutés à l'extrait sec pour silylation dans un flacon bouché, chauffé à 105 °C pendant 15 minutes. Le mélange refroidi est dissous dans 1 mL d'hexane avant. Les chromatographes utilisés par les participants sont tous équipés d'un détecteur FID et d'une colonne capillaire peu polaire (biphényl 5 %-diméthyl 95 % polysiloxane). Le volume d'injection est de 1 µL. Les conditions chromatographiques optimisées sont une température de l'injecteur de 250 °C, et du détecteur de 320 °C. Le programme de température de la colonne est de 80 °C, 10 °C/minute jusqu'à 280 °C, de 280 °C à 308 °C à 0,5 °C/minute, puis de 308 °C à 320 °C à 2 °C/minute. Enfin la colonne était maintenue à 320 °C pendant 3 minutes. Le gaz vecteur varie selon les indications du tableau 2.

**Quantification**  
Une solution étalons non commerciaux de phytostérols a été préparée à partir d'un mélange de campestérol, B-sitostérol, sitostérol, Δ<sup>7</sup>-stigmastérol, Δ<sup>7</sup>-avenastérol et bêta-sitostérol. L'identification des pics est réalisée en tenant compte, d'une part, des temps de rétention

des étalons et, d'autre part, des temps de rétention relatifs rapportés à la bêta-sitostérol. Une méthode d'étalonnage interne a été utilisée pour déterminer la teneur en stérol individuel ( $T_{st}$ ) et en stérols totaux ( $T_{st}$ ). Ces teneurs, exprimées en mg/100 g, sont calculées comme suit :

$$T_{st} = \frac{A_i \cdot m_{\text{étalon}}}{A_{\text{étalon}} \cdot m_{\text{prise}}} \cdot 100 \quad (1)$$

$$T_{st} = \frac{\sum A \cdot m_{\text{étalon}}}{A_{\text{étalon}} \cdot m_{\text{prise}}} \cdot 100 \quad (2)$$

Où les notations représentent :

$A_i$	Aire du pic du stérol considéré
$A_{\text{étalon}}$	Aire du pic de l'étalon interne
$\Sigma A$	Somme des surfaces des pics des stérols (étalon interne excepté)
$m_{\text{étalon}}$	Masse de bêta-sitostérol ou d'épico-prostanol (mg)
$m_{\text{prise}}$	Masse de la prise d'essai (g)

En fonction des matrices et des laboratoires, jusqu'à 15 phytostérols différents ont pu être quantifiés. La somme des stérols totaux a été ajoutée à la liste. Le tableau 3 présente ces divers analytes et les abréviations utilisées dans le reste du texte.

Tableau 3. Liste des analytes et de leurs abréviations.

Abréviation	Stérols analysés
SAVE	Δ <sup>5</sup> -avenastérol
5STI	Δ <sup>5,24</sup> -stigmastadinol
7AVE	Δ <sup>7</sup> -avenastérol
7CAM	Δ <sup>7</sup> -campestérol
7STI	Δ <sup>7</sup> -stigmastérol
AUTR	Autres stérols
BRAS	Brassicastérol
BSIT	B-Sitostérol
CAMP	Campestanol
CHAL	Cholestérol
CHOL	Cholestérol
COMP	Campestérol
METH	24-méthylène cholestérol
SITO	Sitostérol
STIG	Stigmastérol
TOTO	Stérols totaux

## Résultats

### Estimation de la fidélité (reproductibilité)

Au total, environ 900 mesures ont été collectées au cours des différentes analyses inter-laboratoires qui ont été organisées. Mais du fait du déséquilibre de certains plans d'essais (répétitions absentes, matrices traitées de façon différente,...) elles n'ont pas pu toutes être utilisées pour calculer les critères de fidélité de la méthode. À titre indicatif, le *tableau 4* fournit les valeurs moyennes, tous laboratoires confondus. On observe une assez bonne cohérence entre SPE et CCM, sauf pour le  $\Delta^7$ -stigmastérol. L'absence de certains résultats SPE ne signifie pas que le stérol n'ait pas été identifié mais que la méthode n'a pas été appliquée.

Les écarts-types de répétabilité et reproductibilité ont été calculés selon la norme ISO 5725 [6]. Dans le *tableau 5*, la colonne « Nombre » représente le nombre de répétitions ayant servi aux calculs. La colonne « R de Horwitz » contient ce qu'on peut appeler la valeur théorique de l'écart-type de reproductibilité, tel que défini par l'équation de Horwitz, où  $M$  représente la teneur de l'échantillon et qui vaut :

$$R = 0,02 \times M^{0,8949} \quad (3)$$

Ce critère est largement accepté pour juger de la qualité d'une reproductibilité. Le rapport de Horwitz est obtenu en divisant la valeur observée de la reproductibilité par la valeur théorique  $R$  Horwitz. On estime que ce rapport doit être inférieur à 2,0, ce qui n'est pas souvent le cas pour cette étude. Mais le nombre de laboratoires étant faible (normalement il faut 8 laboratoires au moins), cette appréciation défavorable doit être relativisée. Plutôt que de porter un jugement de valeur, il vaut mieux prendre ces valeurs pour ce qu'elles sont et comme des indications de l'état de l'art dans le domaine de l'analyse des phytostérols.

Un mode classique de représentation d'une analyse inter-laboratoires consiste à porter sur un diagramme l'écart-type de reproductibilité  $s_R$  et la concentration moyenne  $M$ . La *figure 1* illustre comment ces deux statistiques sont liées.

Si on prend soin de représenter les 2 axes en échelle logarithmique, il apparaît clairement que  $s_R$  et  $M$  sont liés par une fonction puissance du type :

$$s_R = 0,846 \times M^{0,8034} \quad (4)$$

Bien qu'elle indique que les performances de la méthode pourraient être améliorées, cette équation est malgré tout assez proche de celle

de Horwitz. Surtout, elle indique que l'analyse s'est effectuée dans de bonnes conditions et elle fournit une base pour calculer la reproductibilité quelle que soit la concentration. On verra comment s'en servir pour calculer l'incertitude des mesures.

### Comparaison CCM-SPE

Un des objectifs complémentaires de l'étude était de savoir si la purification par CCM donne des résultats différents de ceux de la SPE. Cependant, démontrer l'équivalence de 2 méthodes est toujours délicat en l'absence d'une limite de tolérance qui précise l'écart acceptable. Une méthode graphique possible consiste à comparer les moyennes obtenues avec les 2 méthodes de purification pour les différents stérols. Dans ce cas, on peut regrouper les données de 10 échantillons. Au total, 81 couples de valeurs répétées peuvent être réunis pour conduire la comparaison.

La *figure 2* illustre graphiquement ces résultats. Pour tenir compte du fait que les deux méthodes sont entachées d'une erreur aléatoire, on a reporté sur le graphique l'erreur-type calculée pour chaque méthode. Cette statistique intègre le nombre de mesures pour chaque moyenne.

Tableau 4. Teneurs moyennes en fonction de la matrice et de la méthode.

Stérol	Méthode	Blé dur	Brocoli	Chocolat	Haricots	Huile Colza	Huile Noix
5AVE	CCM	39,8	26,3	36,0	25,8	489,7	66,5
	SPE	31,5	61,8	34,3	35,5	420,1	123,1
5STI	CCM	6,1					
	SPE	4,8					
7AVE	CCM	4,4					
	SPE	5,4					
7STI	CCM	5,4	9,5	9,5		20,2	9,2
	SPE	12,3	33,8	51,9		136,5	110,1
AUTR	CCM	24,6	58,3	35,3		384,8	101,3
	SPE					345,5	
BRAS	CCM					1149,6	
	SPE					1039,8	
BSIT	CCM	258,8	2742,0	1023,0	320,1	4845,1	1354,0
	SPE	242,4	2231,1	820,0	500,9	4343,6	1643,9
CAMP	CCM	68,9					
	SPE	77,0					
CHOL	CCM	5,4	46,4	29,9	4,2	64,6	14,8
	SPE	2,8	16,8	40,1	7,1	72,2	11,4
COMP	CCM	85,4	568,3	156,6		3450,4	85,6
	SPE	88,4	478,1	122,0		3314,6	112,3
METH	CCM				28,9		
	SPE				49,0		
SITO	CCM	66,4		10,5	13,2	317,2	28,1
	SPE	91,7					56,2
STIG	CCM	8,1	100,8	409,8	191,5	25,4	10,9
	SPE	7,1	85,8	334,8	295,1		
TOTO	CCM	540,2	3524,4	1683,9	610,9	10488,3	1551,6
	SPE	575,6	2977,5	1338,5	923,8	9706,1	2017,8

Tableau 5. Estimation des écarts-types de fidélité toutes méthodes confondues.

Matrice	Stérol	Nombre	Moyenne	Reproductibilité	R de Horwitz	Rapport de Horwitz
Blé dur	SAVE	10	36,503	10,981	2,137	5,139
Blé dur	SSTI	10	5,536	2,496	0,395	6,316
Blé dur	7AVE	9	4,743	0,977	0,344	2,840
Blé dur	7STI	10	8,175	6,211	0,560	11,090
Blé dur	AUTR	6	24,617	17,420	1,502	11,599
Blé dur	BSIT	14	254,129	42,330	12,131	3,489
Blé dur	CAMP	14	71,249	16,154	3,888	4,155
Blé dur	CHOL	10	4,857	2,825	0,351	8,037
Blé dur	COMP	14	86,279	15,337	4,614	3,324
Blé dur	SITO	14	73,643	26,047	4,004	6,505
Blé dur	STIG	14	7,825	1,654	0,539	3,072
Blé dur	TOTO	14	550,332	96,790	24,222	3,996
Brocoli	SAVE	8	44,023	64,858	2,527	25,669
Brocoli	7STI	10	19,185	13,682	1,202	11,386
Brocoli	AUTR	7	58,343	47,220	3,251	14,525
Brocoli	BSIT	15	2605,755	714,464	97,398	7,336
Brocoli	CHOL	15	38,499	37,929	2,241	16,925
Brocoli	COMP	15	544,207	146,629	23,981	6,114
Brocoli	STIG	15	96,799	25,720	5,114	5,029
Brocoli	TOTO	15	3378,562	885,628	122,883	7,207
Chocolat	SAVE	13	35,578	36,741	2,088	17,594
Chocolat	7STI	7	21,597	24,678	1,336	18,473
Chocolat	AUTR	6	35,333	22,367	2,075	10,777
Chocolat	BSIT	14	964,974	225,683	40,038	5,637
Chocolat	CHOL	12	31,607	15,052	1,878	8,013
Chocolat	COMP	14	146,711	38,058	7,420	5,129
Chocolat	SITO	4	10,470	0,253	0,699	0,362
Chocolat	STIG	14	388,344	90,951	17,730	5,130
Chocolat	TOTO	14	1585,221	397,068	62,430	6,360
Colza	SAVE	8	472,276	49,255	21,124	2,332
Colza	7STI	6	58,917	68,569	3,280	20,908
Colza	AUTR	8	374,969	31,838	17,183	1,853
Colza	BRAS	14	1133,877	104,959	46,255	2,269
Colza	BSIT	14	4773,462	435,955	167,424	2,604
Colza	CHOL	12	65,275	25,614	3,595	7,126
Colza	COMP	14	3431,019	403,281	124,589	3,237
Colza	SITO	8	317,163	282,276	14,792	19,083
Colza	STIG	8	25,363	9,348	1,543	6,060
Colza	TOTO	14	10376,522	869,018	335,424	2,591
Haricots	SAVE	8	28,195	16,086	1,696	9,486
Haricots	BSIT	14	345,904	113,727	15,986	7,114
Haricots	CHOL	13	4,450	3,682	0,325	11,331
Haricots	METH	14	31,774	11,513	1,887	6,100
Haricots	SITO	10	13,221	9,151	0,861	10,627
Haricots	STIG	14	206,289	73,101	10,066	7,262
Haricots	TOTO	14	655,562	203,596	28,328	7,187
Huile Noix	SAVE	6	85,335	46,634	4,569	10,207
Huile Noix	7STI	6	42,837	59,331	2,466	24,062
Huile Noix	AUTR	5	101,300	101,919	5,327	19,134
Huile Noix	BSIT	13	1443,176	244,454	57,399	4,259
Huile Noix	CHOL	8	14,371	12,247	0,928	13,200
Huile Noix	COMP	12	94,508	19,182	5,006	3,832
Huile Noix	SITO	6	42,137	33,566	2,430	13,815
Huile Noix	STIG	7	10,930	1,102	0,726	1,518
Huile Noix	TOTO	13	1695,060	339,192	66,287	5,117

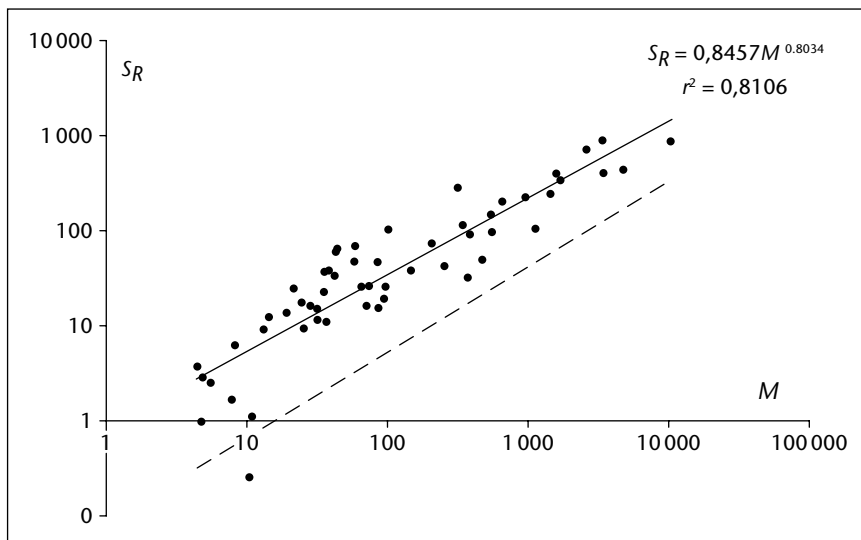


Figure 1. Représentation de l'écart-type de reproductibilité  $s_R$  en fonction de la concentration en phytostérols (mg/100g), toutes méthodes confondues. Chaque point représente une valeur calculée de  $s_R$ . La droite continue illustre le modèle pour les phytostérols, la droite pointillée le modèle général de Horwitz.

On observe un assez bon alignement des points avec quelques données qui s'éloignent. Dans ce cas, on ne peut pas utiliser la méthode des moindres carrés pour calculer la relation fonctionnelle entre les 2 méthodes car il n'y a pas de variable explicative. Si on applique une méthode de régression orthogonale en tenant compte du rapport des variances des 2 méthodes, on obtient une pente qui varie entre 1,09 et 1,14 selon le rapport de variances choisi ( $r=0,954$ ). Le calcul des intervalles de confiance de ces pentes montre que la valeur 1,0 est toujours comprise. On peut alors conclure à l'équivalence des 2 méthodes de purification même si ces résultats font penser que la SPE donne des valeurs 10 % plus élevées. Cette équivalence est aussi confirmée si on calcule l'écart-type de reproductibilité des résultats CCM seuls et si on le représente comme précédemment en fonction de la moyenne (figure 3).

La nouvelle équation obtenue est :

$$s_R = 0,640 \times M^{0,8018} \quad (5)$$

Elle est très proche de l'équation (4) qui représente tous les méthodes confondues. Du fait du déséquilibre de certains plans d'essai, il n'était pas possible de calculer la même équation pour les résultats SPE seuls.

### Estimation de l'incertitude élargie

À partir de ces résultats, il est possible de calculer une fonction d'incertitude du dosage des phytostérols. En effet, la norme ISO 21748 [9] propose des méthodes pour évaluer l'incertitude élargie  $U(M)$  à partir des résultats d'analyses circulaires. Bien que les résultats obtenus ici

soient sans doute surévalués du fait du petit nombre de laboratoires, il est possible de proposer un modèle « pessimiste » de la fonction d'incertitude en prenant 2 fois l'écart-type de reproductibilité (exprimée en % de la concentration) en fonction de la concentration. La figure 4 illustre le modèle ainsi obtenu dont l'équation est fournie par (6) pour des teneurs exprimées en  $\text{mg.kg}^{-1}$ .

$$U(M) = 1,2 \times M^{0,1612} \quad (6)$$

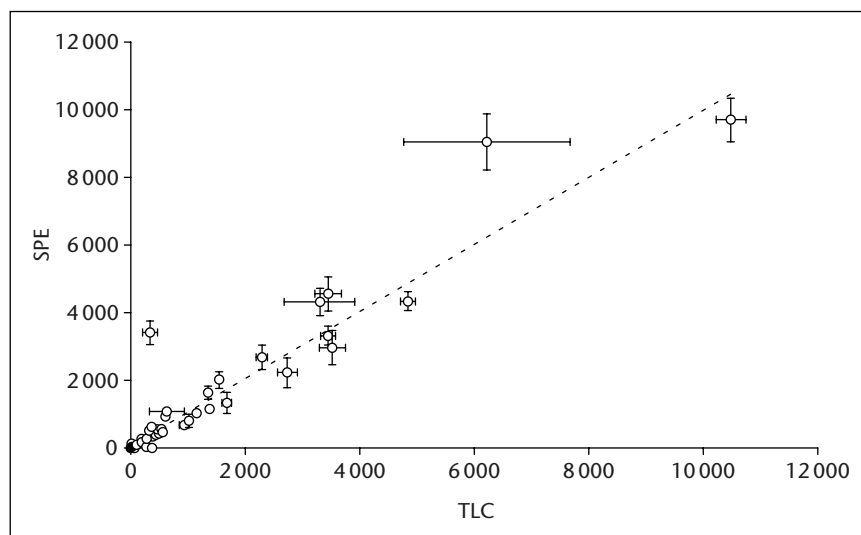


Figure 2. Comparaison de la SPE et de la CCM à partir de mesures réalisées sur 10 échantillons, pour différents stérols. La droite pointillée représente la première bissectrice sur laquelle devraient s'aligner tous les points si les deux méthodes étaient parfaitement équivalentes. Les barres d'erreur indiquent les erreurs types de chaque méthode pour chaque phytostérol.

On peut ainsi retenir un certain nombre de valeurs arrondies pour des teneurs exprimées en  $\text{mg}/100 \text{ g}$  qui se situent :

entre	et	l'incertitude est de
2	5	110 %
6	10	90 %
11	50	80 %
51	100	65 %
101	500	57 %
501	1 000	45 %
1 001	5 000	40 %
5 001	10 000	30 %

## Conclusion

Les laboratoires participants sont en général des laboratoires spécialisés dans l'analyse des aliments et la plupart fonctionnent sous accréditation. Même s'ils sont peu nombreux, les résultats obtenus peuvent être considérés comme représentatifs de l'état de l'art dans le domaine de l'analyse des phytostérols dans les aliments. À l'évidence, ils démontrent que l'analyse des phytostérols reste un objectif délicat et qu'un travail de normalisation doit être réalisé sur des bases modernes, c'est-à-dire accompagné d'une étude inter-laboratoires internationale qui impliquerait au moins 8 laboratoires. En particulier, alors que la supplémentation de certains aliments en phytostérols est devenue une pratique courante, on peut s'étonner qu'aucune méthode de référence spécialement dédiée aux aliments supplémentés ne soit en cours de développement et de validation.



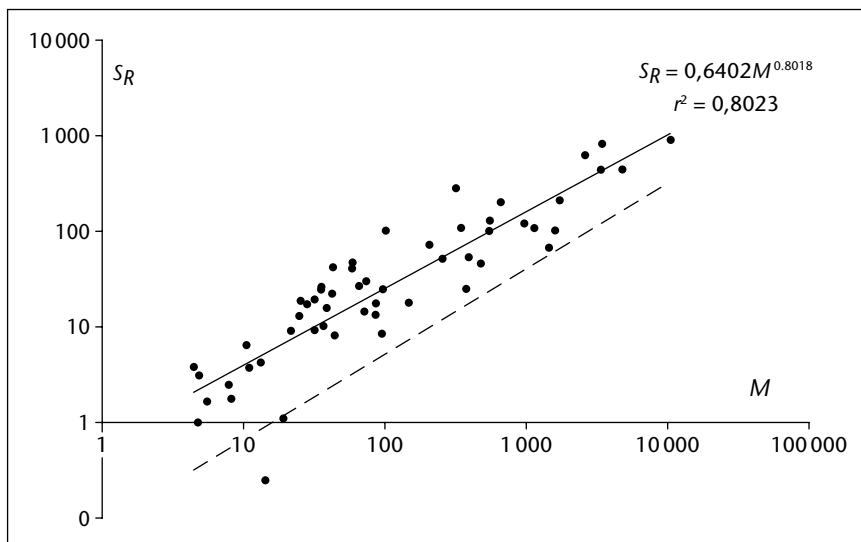


Figure 3. Représentation de l'écart-type de reproductibilité  $s_R$  en fonction de la concentration en phytostérols (mg/100 g), pour les résultats obtenus par CCM. Chaque point représente une valeur calculée de  $s_R$ . La droite continue illustre le modèle pour la méthode CCM, la droite pointillée le modèle général de Horwitz.

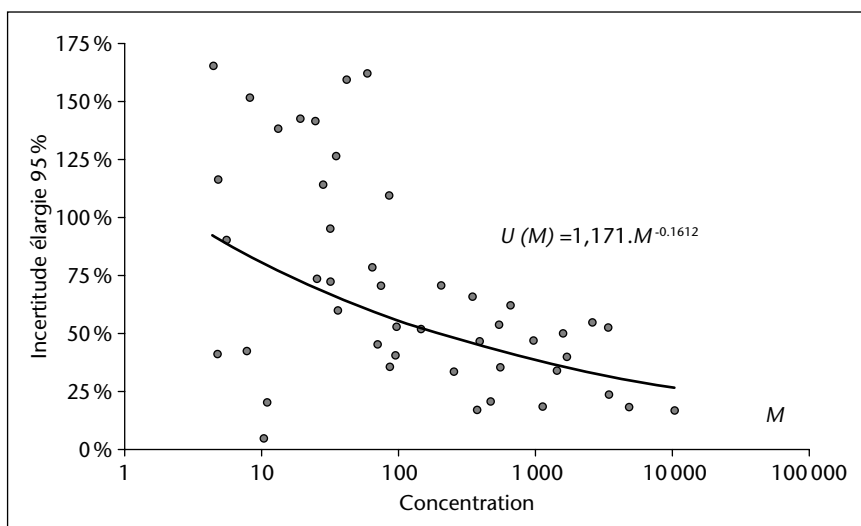


Figure 4. Fonction d'incertitude pour le dosage des phytostérols dans les aliments. Chaque point fournit une valeur d'incertitude pour un niveau de concentration. La courbe continue indique la valeur moyenne de l'incertitude élargie en fonction de la concentration  $M$ .

Les enquêtes effectuées sur des aliments consommés et les tables de composition qui ont été publiées [10] indiquent que les teneurs rencontrées se situent dans le domaine où cette étude a été réalisée. Par conséquent, les valeurs d'incertitude calculées au moyen des données collectées dans cette étude sont tout à fait applicables. Il serait donc valable d'en tenir compte lors des évaluations d'apport qui peuvent être calculées à l'aide des enquêtes de consommation. Une évaluation réaliste du sta-

tut nutritionnel des phytostérols, par exemple de la population française, nécessite donc encore un effort sur le plan analytique et une certaine prudence doit être de mise dans les recommandations ou allégations nutritionnelles. Quand on parle d'effort analytique, il s'agit toujours d'un coût et il n'est pas toujours facile de mobiliser les moyens nécessaires. Cette étude financée par une subvention du ministère de l'Agriculture, malgré ses limites, doit être soulignée comme une contribution fruc-

tueuse pour la connaissance du statut nutritionnel des phytostérols.

**Remerciements.** Ces travaux ont été rendus possibles grâce à la collaboration et aux mesures effectuées par D Aoudé-Werner de Aérial (Strasbourg), M J Amiot-Carlin et J Kaloustian de l'UMR Nutrition humaine et lipides : biodisponibilité, métabolisme et régulations Inra-Inserm (Marseille), J Redon et H Biaudet de l'Institut supérieur d'hygiène et d'analyse (ISHA, Longjumeau) et H Lechat de l'Institut technique d'étude et de recherche des corps gras (Iterg, Pessac).

## RÉFÉRENCES

1. International Union of Pure Applied Chemistry. Method 2.401. In : PAQUOT C, HAUTFENNE A, eds. *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives*, 7th ed. Oxford, UK : Blackwell Scientific Publication, 1987.
2. International Union of Pure Applied Chemistry. Method 2.403. In : PAQUOT C, HAUTFENNE A, eds. *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives*, 7th ed. Oxford, UK : Blackwell Scientific Publication, 1987.
3. ISO 12228. *Determination of individual and total sterols*. Geneva, Switzerland : International Organisation for Standardization, 1999.
4. AOCS. Official Method Ch 6-91. Olive Oil, Sterol Fraction by TLC and Capillary GLC. USA : American Oil Chemists' Society, 1997.
5. LAGARDA MJ, GARCIA-LLATAS G, FARRÉ R. Analysis of phytosterols in foods : Review. *J Pharm Biomed Anal* 2006 ; 41 : 1486-96.
6. ISO 5725. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 2 : Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method. Geneva, Switzerland : International Organisation for Standardization, 1994.
7. HORWITZ W. Harmonized protocol for the design and interpretation of collaborative studies. *TrAC Trends Anal Chem* 1988 ; 7(4) : 118-20.
8. BOYER KW, HORWITZ W, ALBERT R. Interlaboratory Variability in Trace Element. *Analysis Anal Chem* 1985 ; 57(2) : 454-9.
9. ISO/TS 21748. Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation. Geneva, Switzerland : International Organisation for Standardization, 2004.
10. NORMÉN L, BRYNGELSSON S, JOHNSON M, et al. The phytosterol content of some cereal foods commonly consumed in Sweden and in the Netherlands. *J Food Comp Anal* 2002 ; 15 : 693-704.